

ELECTROCHEMICAL DETECTION METHOD OF GENE AND APPARATUS THEREFOR

Patent Number: JP9288080
Publication date: 1997-11-04
Inventor(s): TAKENAKA SHIGEORI
Applicant(s): SHINNITSUKA KANKYO ENG:KK;; TAKENAKA SHIGEORI
Requested Patent: ☐ JP9288080
Application Number: JP19960102957 19960424
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N27/327; G01N27/06; G01N33/483; G01N33/58
EC Classification:
Equivalents: JP3233851B2

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable detection of a DNA sequence without fragmentation by a method wherein a DNA probe modified with a conductive substance is immobilized on an electrode and caused to react with a material containing DNA with the presence of an intercalater to detect an electrode current after the reaction.

SOLUTION: A probe DNA employing DNA extracted from a living being sample or DNA chemically synthesized is modified by a conductive substance such ferrocene and immobilized on an electrode made of gold, glassy carbon or the like. The electrode is introduced into an specimen solution containing a DNA sample to form a hybrid DNA with the presence of an intercalater such as ferrocene compound. The amount of a current flowing through the electrode changes by the intercalation and the amount of the current is measured to determine the quantity of the hybrid DNA. This method eliminates the need for a division device or the like thereby enabling detection and measurement of a DNA of a specified sequence simply.

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-288080

(43) 公開日 平成9年(1997)11月4日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 1
	27/08		27/08	Z
	33/483		33/483	F
	33/58		33/58	A

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平8-102957	(71) 出願人	000148755 株式会社新日化環境エンジニアリング 福岡県北九州市戸畑区中原先の浜46番地の 80
(22) 出願日	平成8年(1996)4月24日	(71) 出願人	598057011 竹中 繁雄 福岡県粕屋郡古賀町千島1-3-15-203
		(72) 発明者	竹中 繁雄 福岡県粕屋郡古賀町千島1-3-15-203
		(74) 代理人	弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 遺伝子の電気化学的検出法およびその装置

(57) 【要約】

【課題】簡便な感度のよいDNAの検出、測定を行うこと

【解決手段】導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極と、DNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、該DNAプローブとDNAとのハイブリッドDNAを形成させる、該反応後の電極の電流を検出および／または測定する。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特定の配列を有するDNAを検出する方法であって、該方法は、導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極と、DNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、該DNAプローブとDNAとのハイブリッドDNAを形成させる工程；および、該反応後の電極の電流を検出および／または測定する工程；を有する、方法。

【請求項2】 前記導電性物質が酸化還元活性を有する化合物である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記インターカレータが、フェロセン修飾縫い込み型インターカレータである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 特定の配列を有するDNAを検出する装置であって、該装置は、導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極；該電極に固定されたDNAプローブとDNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、ハイブリッドDNAを形成させる手段；および、

該反応後の電極の電流を検出および／または測定する手段；を有する、装置。

【請求項5】 前記導電性物質が酸化還元活性を有する化合物である、請求項4に記載の装置。

【請求項6】 前記インターカレータがフェロセン修飾縫い込み型インターカレータである、請求項4に記載の装置。

【請求項7】 導電性の物質で修飾されたDNAプローブが電極に固定されている、特定のDNA配列を検出するための電極。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNAの検出装置、および検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生物学、医学分野での遺伝子解析においては、特定の配列を有するDNAを検出する手段として、ハイブリダイゼーション方法が用いられている。

【0003】この中でも、特に、いわゆるサザンハイブリダイゼーションが一般的に用いられている。このサザンハイブリダイゼーションは一般的には、まず、被験DNAを1種類以上の制限酵素でフラグメントとした後、ゲル電気泳動にかけてサイズによって分離する。次に被験DNAを一本鎖DNAに変性した後、ナイロン・フィルターまたはニトロセルロース・ペーパーに固定化する。そして、この変性された一本鎖DNAと、放射性同位元素（以下、RIという）でラベルされた塩基対を形成する相補的な一本鎖DNA（以下、DNAプローブという）とをハイブリダイズさせて、フィルター（ニトロセルロースペーパー）を洗浄する。洗浄後、上記フィルター（ニトロセルロースペーパー）をオートラジオグラ

フにかけ、現像することによって、プローブDNAとハイブリダイズする特定の配列を有するDNAが検出される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のサザンハイブリダイゼーションなどの従来法は、標識として放射性同位元素を用いるため、放射性物質取扱施設とその維持管理に多大な費用と労力を要するばかりでなく、研究者の健康上の安全も保証されない。またオートラジオグラフィーでバンドとして検出するためには24時間以上の時間を要する。さらに、被験DNA量が少ない場合には、フィルムを感光させるためには長時間の曝露が必要であり、またバンドの輪郭が不明瞭となる問題点がある。

【0005】サザンハイブリダイゼーション法において、RIの代わりに蛍光物質をプローブの標識とする方法も提案されている。この方法は安全性と迅速さにおいては、RIに優るが、励起光による褪色が起こること、測定には専用の蛍光測定装置が必要であること、さらに蛍光の内部消光のために一定量以上の蛍光物質をプローブとして導入することは困難であること、などの欠点を有している。また、近年、発光にてDNAを検出する方法も実用化されてきたが蛍光法と同様に専用測定装置が必要である。

【0006】上記のように、種々の検出方法が検討されているが、いずれも、特定の遺伝子配列の有無を検出するためには、検体から取り出したDNAを制限酵素でフラグメント化したのち、電気泳動等の手法により、サイズにより分離し、被験DNAをニトロセルロースペーパー等に固定化せねばならず煩雑であるという問題点は、未解決である。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記の問題点を解決することを目的としてなされたものであり、検体のDNAを断片化することなく、特定の配列を有するDNA配列を検出する方法および装置を提供することにある。

【0008】本発明は、一本鎖のDNAプローブを電極表面に固定化し、溶液系でインターカレータの存在下、被験DNAとプローブDNAとの相補的二本鎖DNAを形成させ、形成された二本鎖DNAの検出を、電極の電流変化を電気化学的シグナルとして検出および／または測定する発明に関する。

【0009】従って、本発明は、特定の配列を有するDNAを検出する方法であって、導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極と、DNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、該DNAプローブとDNAとのハイブリッドDNAを形成させる工程；および、該反応後の電極の電流を検出および／または測定する工程；を有する、方法に関する。

【0010】好適な実施形態においては、反応後に電極

を洗浄する工程を含む。

【0011】好適な実施形態においては、前記導電性物質が酸化還元活性を有する化合物である。さらに好ましくは、前記化合物がフェロセンである。

【0012】また、好適な実施形態においては、前記インターカレータが、フェロセン修飾縫い込み型インターカレータである。縫い込み型インターカレータとは、DNAへのインターカレーション時に二つの置換基が主流にそれぞれ突き出した複合体を形成する薬剤である。従って、縫い込み型インターカレータがDNAからはずれず、置換基の一つがストッパーとして働く。これによって二本鎖核酸からの解離は極めて遅い。一本鎖ではこのようなことが起こらないため素早く解離する。従って、縫い込み型インターカレータが好適に用いられ得る。

【0013】さらに、本願発明は、特定の配列を有するDNAを検出する装置に関し、導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極；該電極に固定されたDNAプローブとDNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、ハイブリッドDNAを形成させる手段；および、該反応後の電極の電流を検出および／または測定する手段；とを有する、装置に関する。

【0014】好適な実施形態においては、反応後の電極を洗浄する手段を有する。

【0015】好適な実施形態においては、前記導電性物質が酸化還元活性を有する化合物であり、好ましくは、酸化還元活性を有する化合物がフェロセンである。

【0016】好適な実施形態においては、前記インターカレータがフェロセン修飾縫い込み型インターカレータである。

【0017】

【発明の実施の形態】本願発明の方法あるいは装置に用いられる電極としては、核酸を固定できるものであればいづれをも使用し得る。好適には金、グラシーカーボン、炭素などが挙げられる。

【0018】DNAを修飾する導電性の物質としては、導電性を有する物質であればいずれもが用いられ得る。特に酸化還元活性を有する物質が好ましい。フェロセン、カテコールアミン、金属ビピリジン錯体、金属フェナンスリン錯体、ピオローゲンが好ましく、特にフェロセンが好ましい。

【0019】プローブDNAとしては、生物試料から抽出したDNAを制限酵素で切断し、電気泳動による分離などで精製したDNA、あるいは化学合成したDNAのいずれもが用いられ得る。プローブDNAの配列はあらかじめ決定しておくことが好ましい。DNA配列決定法は周知である。

【0020】プローブDNAは、導電性の物質と結合させるために、5'あるいは3'末端が例えばアミノ基で修飾され得る。導電性の物質とDNAとの結合は、当業

者に公知の方法が用いられ得る。5'末端にアミノ基が導入されたDNAとフェロセンとを例に挙げて説明すると、DNAを適当な緩衝液（例えば、炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液）に溶解し、これに例えば、フェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを含む有機溶媒（例えば、DMSO）を加えて反応させ、HPLCなどを用いて精製することにより、5'末端側にフェロセンが結合したDNAが得られ得る。

【0021】この導電性物質で修飾されたプローブを電極に固定する。固定化方法としては、公知の方法が用いられ得る。例えば、電極が金である場合、DNAにチオール基を導入し、金と硫黄との金-硫黄配位結合を介してDNAが電極に結合され得る。DNAにチオール基を導入する方法は、Mizuo MAEDA, Koji NAKANO, Shinji UCHIDA, and Makoto TAKAGI, Chemistry Letters, 1805-1808 (1994) あるいはB.A. Corinolly, Nucleic Acids Res., 13, 4484 (1985) に記載されている。上記の方法で得られるチオール基を有するDNAを金電極に滴下し、低温下（例えば4℃）で、数時間放置することにより、フェロセンで修飾されたDNAが金電極に固定化され得る。

【0022】他の方法として、グラシーカーボンを過マンガン酸カリウムで酸化することにより電極表面にカルボン酸を導入し、核酸のアミノ基とアミド結合形成させて固定化し得る。グラシーカーボンへの固定化は、Kelly M. Millan and Susan R. Mikkelsen, Analytical Chemistry 65, 2317-2323 (1993) に記載されている。

【0023】上記で得られた、導電性物質で修飾されたプローブDNAが結合した電極を、DNA試料を含む検体溶液に導入することにより、プローブDNAと相補的な配列を有するDNAがハイブリダイズし、ハイブリッドDNAが形成される。DNAをハイブリッドさせる方法は周知である。

【0024】本願発明の装置は、好ましくは、反応溶液を加熱する加熱手段を有する。必要に応じて、冷却手段を有し得る。加熱により、二本鎖DNAを解離して一本鎖とし、プローブとハイブリダイズさせるためである。

【0025】このハイブリダイゼーションは、インターカレータの存在下行う。インターカレータが共存すると、ハイブリダイゼーションの形成が早められると同時に、生じたハイブリッドDNAを安定化し得る。

【0026】本願発明に用いられ得るインターカレータとしては、フェロセン化合物、カテコールアミン化合物、金属ビピリジン錯体、金属フェナンスリン錯体、ピオローゲン化合物などが挙げられる。フェロセン、カテコールアミン、金属ビピリジン錯体、金属フェナンスリン錯体、ピオローゲンなどを導入した縫い込み型インターカレータなどが好ましく、特に好ましくは、フェロセン修飾縫い込み型インターカレータである。

【0027】ハイブリダイズ反応液中のインターカレー

タは、 10^{-4} M〜 10^{-6} Mオーダーの濃度範囲で用いられ得る。好ましくは 10^{-4} M〜 5×10^{-5} Mであり、最も好ましくは 0.5×10^{-5} Mである。

【0028】インターカレータは、ハイブリッドDNAの層間に侵入し、一種の電荷移動錯体を形成する。ハイブリッドを形成しない場合（つまり一本鎖のままであれば）インターカレーションは起こらない。インターカレーションにより、電極に流れる電流量が変化する。この電流は（ハイブリダイズにより形成された）二本鎖DNAにインターカレートしたインターカレータの酸化、還元によるものである。二本鎖DNAの形成の程度がインターカレートの程度として検出され得る。従って、この電流量を検出および／または測定することにより、ハイブリッドDNAの存在が検出され、あるいはハイブリッドDNAの量が測定される。従って、本願発明の装置は、電流量を検出および／または測定する手段を有する。このような手段（装置）としては、サイクリックボルタモグラム、デファレンシャルパルスボルタモグラム、ポテンシオスタットが挙げられる。

【0029】電流量の検出／測定に際し、インターカレータ存在下におけるハイブリダイゼーション反応後、電極を洗浄し、遊離のインターカレータを除いておく。従って、本願発明の装置は、電極の洗浄手段を有し得る。

【0030】以上のようにして、本願発明の装置に用いられる、導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極、該電極に固定されたDNAプローブとDNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、ハイブリッドDNAを形成させる手段、および、該反応後の電極の電流を検出および／または測定する手段が提供され、本願発明の装置が作成され得る。

【0031】特定の配列を有するDNAは、上記の装置を用いて検出され得る。

【0032】特定の配列を有するDNAを検出する方法は、例えば上記の作成方法で作成された導電性の物質で修飾されたDNAプローブが固定された電極と、DNAを含む試料とをインターカレータ存在下に反応させ、該DNAプローブとDNAとのハイブリッドDNAを形成させる。ハイブリダイズの条件は周知である。より厳密に特定する場合は、用いるプローブの塩基組成あるいは長さ等によって、ハイブリダイズの条件、適切な塩濃度と時間などが設定され得る。

【0033】ハイブリダイズ反応後、電極を洗浄し、不要なインターカレータを洗い流し、電極の電流量を検出および／または測定することにより、ハイブリダイズしたDNAを検出および／または測定する。

【0034】以下、実施例をあげて説明するが、本願発明が実施例のみに限定されないことはいうまでもない。

【0035】

【実施例】

(A: フェロセンで修飾されたDNAプローブが固定さ

れた電極の作成)

(1) フェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの合成

フェロセンカルボン酸0.5g(2.2mM)とN-ヒドロキシスクシンイミド0.29g(2.5mM)の20mlジオキサン溶液に、攪拌下ジシクロヘキシルカルボジイミド0.5g(2.5mM)の5mlジオキサン溶液を添加し、24時間室温で攪拌した。反応混合物中に析出した成分のうち、シリカゲルクロマトグラフィー処理により暗黄色成分を分取した。暗黄色成分の特性は下記の通りである。

【0036】

【表1】

分子式	$C_{19}H_{16}FeNO_4$		
性状	黄色固体		
融点	182.0〜182.5℃		
^1H-NMR	ケミカル・シフト(ppm)		
	2.92、4.44、4.61、4.99		
IR	1770 cm^{-1} 、1740 cm^{-1} 、1220 cm^{-1} 、1080 cm^{-1}		
元素分析	H%	C%	N%
計算値	3.99	55.05	4.28
実測値	4.11	54.85	4.52

【0037】(2) フェロセン修飾DNAプローブの合成

DNAプローブとして、チミジンの20マー($T_{20}A$)

【0038】

【化1】

$T_{20}A: NH_2-(CH_2)_6-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT$

【0039】を合成した。合成は、DNA自動合成装置（アプライドバイオシステムズ社製のModel391 PCR-MATE[®]/PCR-MATE EP）を用いて行った。 $T_{20}A$ 26nmol ($E_{260}=8800M^{-1}cm^{-1}$ として算出)を1.3mM炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.0)20μlに溶解した。これに上記(1)で得られたフェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル1.3μmolを含む6mlのDMSO溶液を加え、室温で一晩攪とうした。反応混合物をTEAA (triethylamine-acetic acid 緩衝液) (pH7.0)で1mlに希釈した後、NAP-10カラム (Pharmacia Sephadex G-25)によりTEAA緩衝液を溶離液として保持容量1mlから2.5mlの部分に分取した。これを減圧濃縮(40℃以下)し、逆相HPLC (LiChrospher 100RP-18 (e)/Cica-MERCK)で分取した。収量は7.4nmol (29%)であった。

【0040】(3) フェロセン修飾DNAプローブのチオール化

フェロセン修飾DNAのチオール化は、公知の方法、B. A. Connolly, Nucleic Acids Res., 13, 4484 (1985)に従って行った。

【0041】(4) フェロセン修飾アローブDNAの電極表面への固定化

(3) で得られたチオール基を導入した dT_{20} 量体溶液 $1\mu\text{l}$ ($3.4 \times 10^{-10}\text{mol}$) を、金電極 (0.79cm^2) に滴下し、 4°C で1時間放置した。その後電極を水で洗浄し、洗浄水からチオール基導入 dT_{20} 量体を回収した。HPLCにて、反応しなかったチオール基導入 dT_{20} 量体を測定して、電極に固定された dT_{20} 量体を算出すると $2.9 \times 10^{-11}\text{mol}$ (29pmol) であった。これをトリス塩酸-EDTA (pH7.0) 緩衝液中にて保存した。

【0042】(B: フェロセン修飾縫い込み型インターカレータの調製) フェロセン修飾縫い込み型インターカレータは、上記A(1)で調製したフェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと、下記の方

性状 赤褐色固体

融点 300°C

$^1\text{H-NMR}$ ケミカル・シフト (ppm)

1.58, 1.95, 2.27~2.52, 2.71, 4.28, 8.75

IR C=O 1650cm^{-1}

【0045】(2) フェロセン修飾縫い込み型インターカレータの合成

上記A(1)で調製したフェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと、B(1)の方法で調製したアミン体 (NaDI) とを反応させて合成した。

【0046】アミン体 300mg (0.474mol) と上記A

(1) で調製したエステル 600mg (1.8mmole) とをクロロフォルム 30ml に溶解した。これを室温で50時間攪拌した。これをシリカゲルのTLCにかけメタノールを溶媒として展開した。原点にNaDI, Rf値0.8にフェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル, Rf値0.2にブロードな目的物と思われるスポットが確認された。反応溶液を減圧留去した後、メタノールに溶かし、展開溶媒にメタノールを用いてシリカゲルカラムで展開し、目的物と思われる画分を得た。メタノールを減圧留去し、クロロフォルムに溶かした。ろ過後、ろ液を濃縮し、水で再沈澱させ、アセトンで再結晶し、結晶を回収した。アセトンで再結晶した後のTLC (MeOH) はRf値0.2のスポットのみであった。

【0047】

【表3】

法により作成したアミン体とを用いて合成した。

【0043】(1) アミン体の合成

1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物 2g (7.45mol) と1,4-(3-アミノプロピル) ピペラジン 40ml (0.194mol) をTHF 30ml 中で8時間還流した。室温まで冷やした後それをそのまま、ヘキサンに再沈澱させ、結晶を濃縮により回収した。さらに最少量のクロロフォルムに溶解させエーテルに再沈澱させた。沈澱物を除去後、エーテルを減圧除去する。クロロフォルムに再溶解させ、ヘキサンによる再沈澱後、結晶を回収した。収量は 330mg 、収率 52% であった。

【0044】

【表2】

性状 淡黄色結晶

融点 $237\sim 248^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ ケミカル・シフト (ppm)

1.7, 2.0, 2.5, 3.4, 4.2, 4.3, 4.7, 8.8

IR 1650cm^{-1} , 1630cm^{-1}

元素分析 H% C% N% C/N

計算値 8.10 83.84 10.60 6.00

実測値 8.10 82.72 10.37 6.05

【0048】上記回収物質の収量は 33mg で収率は 7% であった。得られたインターカレータは 382nm に吸収極大を有していた。

【0049】(C: 電極の性能評価) アローブDNAに相補的に結合するDNAフラグメントとしては合成オリゴヌクレオチド dA_{20} を用いた。 dA_{20} 29pmol と上記(B)で作成したインターカレータ 0.5mM とを含む $30\%\text{DMSO}-41\text{mM}$ (AcOK-AcOH) 緩衝液 (pH5.2) に、フェロセン修飾アローブDNA (dT_{20}) が表面に固定化された電極を浸した。反応は、 40°C 、10分間行った。

【0050】反応終了後電極を引き上げ、電極を5秒間 $30\%\text{DMSO}-41\text{mM}$ (AcOK-AcOH) 緩衝液 (pH 5.2) で洗浄し、遊離インターカレータを除去した。

【0051】この電極のサイクリックボルタモグラムの測定したのが、図1である。測定は、 41mM 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.2)、 $30\%\text{DMSO}$ 、スキャン速度 100mV/sec の条件で行った。

【0052】本発明の 29pmol の dT_{20} が結合した電極のフェロセンインターカレータに由来する 619mV の増加電流は $0.15\mu\text{A}$ であった。従って、 dA_{20} が dT_{20} に結合する

ことにより、つまり、電極に固定化されたプローブDNAに相補的なDNAが結合することにより、特定の配列が検出できることがわかる。

【0053】この電極を用い、種々の濃度の dA_{10} と上記(B)で作成したインターカレーター $0.5\mu\text{M}$ を含む30% DMSO-41mM (AcOK-AcOH) 緩衝液 (pH 5.2) に、フェロセン修飾プローブDNA (dT_{10}) が表面に固定化された電極を浸した。反応は、 40°C 、10分間行った。

【0054】反応終了後電極を引き上げ、電極を5秒間30%DMSO-41mM (AcOK-AcOH) 緩衝液 (pH 5.2) で洗浄し、遊離インターカレーターを除去した。

【0055】この電極のサイクリックボルタモグラムの測定した結果を図2に示す。増加電流の検出限界から、上記電極により検出可能なDNAの検出限界は、数fmolと推定された。この図から、特定の配列を有するDNAの検出および定量が可能であることがわかる。

【0056】このDNA検出限界は現行のRI法、蛍光ラベル法、発光法と比較して同等あるいはより高感度である。

【0057】

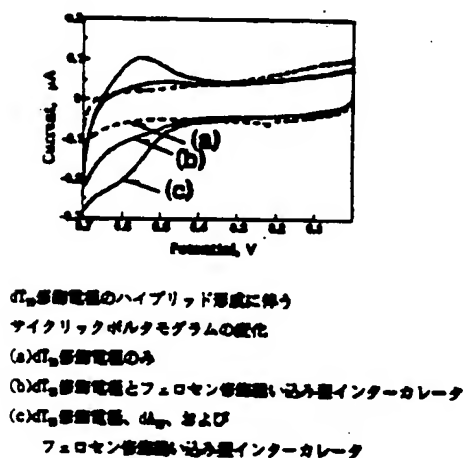
【発明の効果】導電性を有する物質で修飾されたプローブDNAを電極に固定化し、インターカレーター存在下、DNA試料と反応させた後、電極の電流を検出および/または測定することにより、特定の配列を有するDNAが検出および/または測定される。この方法により、従来のRIを用いるオートラジオグラフィーのように数日を要せず、リアルタイムで検出することが可能となる。そしてオートラジオグラフィーで必須の、現像の手間が不要である。さらに、オートラジオグラフィーでは感光度不足が現像によって初めて確認され、感光度が不足する時には再度フィルムを感光させる必要があり、時間的ロスが生じる。本発明では、このような時間的ロスが皆無となる。さらに、被験DNAを制限酵素処理、電気泳動による分画処理などが不要になるため、分画装置などを要せず、簡便に特定の配列を有するDNAが検出、測定され得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の電極のサイクリックボルタモグラムの測定した図である。

【図2】本発明の電極の性能を示す図である。

【図1】



【図2】

